

論文の内容の要旨

論文題目 近位尿細管の管腔側ナトリウム依存性酸塩基輸送機構の解明

氏名 鈴木 淳司

腎臓の近位尿細管ではナトリウム(Na)や重炭酸イオン(HCO_3^-)など生命維持に不可欠な様々な物質の調節が行われている。特に体液量と密接に関係している Na は、糸球体から濾過されたあと複数の輸送機構を介して近位尿細管で約 50~70%が再吸収され体液の恒常性維持に根源的な役割を担っている。また生体内の酸塩基平衡の調節に最も重要な炭酸-重炭酸緩衝系は、近位尿細管が糸球体で濾過された HCO_3^- の約 80%を再吸収し、消費分を補充することで維持されている。重要なことに、この近位尿細管における酸塩基輸送の殆どが Na 輸送と連動しており、尿細管管腔側に発現している Na^+/H^+ 交換輸送体 (Na^+/H^+ exchanger : NHE) 3、基底側に発現している $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送体(Na^+ bicarbonate co-transporter : NBC) e1、管腔側に発現している液胞型 H^+ ポンプ (V-ATPase) が主な輸送体として知られている。

NHE は Na^+ と H^+ を対向輸送する二次性能動輸送体で殆ど全ての生物の細胞に発現しており、生体内の酸塩基平衡を制御する非常に重要な輸送体である。哺乳類には NHE1 から NHE9 までの isoform が同定、クローニングされており、isoform 毎に細胞特異的な局在が知られている。腎臓に発現している NHE1 から NHE4 までの 4 つの isoform のうち NHE1 と NHE4 は尿細管上皮細胞基底側に、NHE2 と NHE3 は管腔側に発現している。近位尿細管の酸塩基輸送機構について検討が重ねられ、管腔側への酸分泌は主に NHE3 を介して Na 依存的に行われていることが確認された。

しかし各種阻害剤や遺伝子欠損動物を用いた解析が可能になるに従い、NHE3 だけでは管腔側の Na 依存性酸塩基輸送を説明できない事象が報告されるようになった。例えば NHE3 の特異的阻害剤 S3226 を用いたラット近位尿細管の微小灌流法による検討では、近位尿細管の Na 再吸収は 30%程度しか抑制されなかった。Nhe 3 欠損マウスはごく軽度の酸血症しか認めず、微小灌流法による検討でも近位尿細管の $\text{Na}^+ \cdot \text{HCO}_3^-$ 再吸収能は 30-40%保たれていた。その後 Nhe 8 がクローニングされ NHE8 が近位尿細管管腔側に局在することが示された。Nhe 3、Nhe8 および Nhe3/Nhe8 二重欠損マウスの検討では、Nhe3/Nhe8 二重欠損マウスは Nhe3 欠損マウスと同程度のごく軽度の酸血症を呈するのみであった。これより近位尿細管管腔側における酸塩基輸送に NHE8 が寄与する割合は NHE3 よりはるかに小さいと考えられた。また小腸 NHE3 を強制発現させたトランスジェニック Nhe3 欠

損マウスや腎臓近位尿細管特異的 *Nhe3* 欠損マウスにおいても、*Nhe3* 欠損マウスと同様にごく軽度の酸血症を呈するのみであった。腎臓近位尿細管特異的 *Nhe3* 欠損マウスから単離した尿細管に対し微小灌流法を用いた検討では、近位尿細管の $\text{Na}^+ \cdot \text{HCO}_3^-$ 再吸収能は約 70% が保たれていた。さらに近年、先天性 Na 下痢症 (CSD) のヒト症例の遺伝子解析により 8 種類の NHE3 の変異が報告されたが、機能廃絶型変異を有する症例でも重篤な酸血症の合併は認められなかった。これは *Nhe3* 欠損マウスが軽度の酸血症と下痢のみを呈していたことと類似しており、近位尿細管の管腔側に NHE3 以外の未知の酸塩基輸送体が存在することが強く示唆されたが詳細不明であった。

本研究では、従来近位尿細管管腔側の Na 依存性酸塩基輸送の中心的役割を担うとされてきた NHE3 以外の未知の輸送体が存在する可能性について、動物やヒト単離尿細管を用いた生理実験を交えた多面的解析を行うことにより、近位尿細管における Na 輸送および酸塩基輸送機構の詳細を明らかにすることを目的として実験を行った。

最初に、近位尿細管の Na 依存性酸塩基輸送を生理実験にて評価した。マウスから単離した近位尿細管を固定し、灌流する溶液の Na 濃度を変化させた際の尿細管上皮細胞内 pH の変化を測定した。その際、灌流液中の HCO_3^- による細胞内 pH への影響を除外するため、全ての灌流液に HCO_3^- を含まない溶液を使用した。灌流液の Na 除去を行うと pH は急速に低下し、Na の再添加により pH は上昇し (NHE 様活性)、Na 依存性に酸塩基輸送が行われていることが明らかになった。さらに split-open 法を用いて管腔側を露出した場合と、露出しなかった場合の比較を行い、split-open 法を用いて観察した尿細管上皮細胞の pH 変化は主に管腔側の輸送体活性を反映することが示された。また灌流液の Na を除去して pH が急速に低下した後、徐々に pH が上昇する反応が観察されたが、これは Na 非依存性の pH 変化であり、管腔側に発現している V-ATPase を介した酸分泌による細胞内酸性化回復が起きていると考えられた。この反応は V-ATPase 特異的阻害剤 bafilomycin の添加により完全に抑制された。一方 bafilomycin は NHE 様活性に影響しないことが確認された。

次に、近位尿細管管腔側の NHE 様活性の本態に迫るため、マウス、ラット、ヒトから単離した近位尿細管に NHE 阻害剤 EIPA : 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride を作用させ NHE 様活性への影響を調べた。マウス、ラットでは EIPA による NHE 様活性の阻害率は 50% 前後であったがヒトでは約 20% と有意に低かった。続いて管腔側 NHE 様活性における NHE3 と NHE8 の比率を調べるため、NHE3 および NHE8 に対する siRNA をマウス単離近位尿細管に導入し、定量 PCR で遺伝子発現抑制効率を評価した。siNHE3 導入により NHE3 mRNA 発現量はコントロール (si-scramble) と比して約 85% が抑制され、siNHE8 導入により NHE8 mRNA 発現量は約 75% が抑制された。さらに、各 siRNA を導入した単離尿細管の管腔側の NHE 様活性を生理実験にて評価し NHE3 および NHE8 の寄与を検討した。NHE3 遺伝子発現を抑制した尿細管の NHE 様活性はコントロール (si-scramble) と比して約 50% に減弱しており、これは阻害剤 EIPA による阻害効果と矛盾しない結果であった。一方で NHE8 遺伝子発現を抑制した尿細管の NHE 様活性はコントロールと有意差はなかった。

次に、管腔側に存在する NHE 以外の酸塩基輸送体として陰イオン輸送体を考慮し、その関与を検討した。まずマウス単離尿細管を用いて、灌流液に Cl⁻を含む場合と含まない場合の NHE 様活性を比較し、細胞外 Cl⁻の有無が Na 依存性酸塩基輸送に影響しないことを確認した。続いてマウス・ラット・ヒトから単離した近位尿細管に陰イオン輸送体阻害剤 DIDS : 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid を作用させ、NHE 様活性への影響を調べた。マウス、ラットでは DIDS による NHE 様活性抑制率は 40%前後であったがヒトでは約 70%と有意に高かった。また EIPA と DIDS を同時に添加して NHE 様活性への影響を同様に調べたところ、マウスでは約 65%であったのに対してラット、ヒトでは 85%程度の抑制率であった。

この DIDS 感受性の、Na 依存性酸塩基輸送能をもつ未知の陰イオン輸送体として、最近報告された Na⁺/HCO₃⁻共輸送体 NBCn2 が考えられた。NBCn2 はラット近位尿細管管腔側に発現していることが確認され、酸塩基輸送機能を有する可能性が提唱されているが、実際の尿細管でどのように酸塩基輸送に関与しているかは明らかでない。このため NBCn2 に対する siRNA をラット単離近位尿細管に導入し、定量 PCR にて遺伝子発現抑制効率を評価した。siNBCn2 導入により NBCn2 mRNA 発現はコントロール(si-scramble)と比較して 90%以上が抑制された。さらに siNBCn2 を導入した単離尿細管に split-open 法を用いて管腔側の NHE 様活性を評価したところ、NBCn2 遺伝子発現を抑制した尿細管の NHE 様活性はコントロールと比較して約 50%が抑制されていた。これは阻害剤 DIDS による抑制効果と矛盾しない結果であった。

さらにラット肝臓・腎臓・脳における NBCn2 蛋白の発現を Western blotting で評価したところ、NBCn2 は腎臓・脳に豊富に発現していたが肝臓には発現していなかった。他方ラット腎臓の免疫組織化学染色では、NBCn2 は水チャネル AQP-1 と同様に近位尿細管上皮細胞膜に発現していることが示された。続いてヒトの腎臓組織を用いて Western blotting および免疫組織化学染色を行い、ラットと同様に NBCn2 が近位尿細管上皮細胞膜、管腔側優位に発現していることが示された。

本研究により、ラット近位尿細管管腔側において NBCn2 が Na 依存性酸塩基輸送を担っていることが示された。また阻害薬を用いた結果から、マウス、ラットと比してヒトでは NBCn2 が Na 依存性酸塩基輸送に強く関与している可能性が示唆された。本研究では重炭酸を含まない実験系で NBCn2 の活性を評価したため、既報の NBCn2 の輸送様式と異なるなど不明な点も多いが、近位尿細管における NBCn2 の制御機構を解明することにより高血圧や酸塩基平衡異常の新規治療方法の開発につながる可能性がある。